

**Plan para Tesis de Licenciatura en Física**  
**Directoras: Silvina Ponce Dawson y Lía Pietrasanta**

**El rol del calcio en la polarización de las células migrantes**

El estudio de la forma en que los organismos vivos, en general, y las células, en particular, procesan la información del medio que los rodea y actúan en consecuencia es de gran interés. Este procesamiento involucra “sensar” las condiciones del ambiente e inducir cambios en las condiciones internas de la célula en base a la información sensada. Estos cambios típicamente se organizan en “cascadas de señalización” donde un cambio induce otro que induce otro y así hasta generar una “respuesta”. Los cambios se manifiestan en la activación de enzimas, modificaciones en la concentración y/o distribución espacial de sustancias mensajeras, cambios en la expresión génica y eventualmente cambios en la estructura y/o forma de la célula. En este proyecto estamos interesados en un proceso de gran relevancia fisiológica: la migración celular. Este proceso del que participan todas las células en algún momento de su desarrollo es crítico para el remodelado y regeneración de tejidos luego de que ocurre un daño y está también involucrado en numerosas patologías como las enfermedades auto-inmunes o las metástasis.

Para que una célula pueda migrar en una dirección debe estar “polarizada”. Esto significa que el frente (el lado hacia el que se desplaza) es distinto de la parte de atrás. Se ha observado en distintos tipos celulares (Hahn et al, 1992; Ridley et al, 2003) y, en particular, en las células migrantes (Wei et al, 2009), que existe un gradiente de calcio intracelular creciente hacia la parte posterior. El calcio participa de innumerables procesos fisiológicos en casi todos los tipos celulares. Tal vez el factor decisivo que lo convirtió en un mensajero universal haya sido el hecho de que se pega muy fácilmente a complejos moleculares y, al hacerlo, induce una reconfiguración de los mismos que les permite cambiar su funcionalidad. Para poder ejercer este rol como mensajero, la concentración de calcio intracelular libre es muy baja en condiciones basales. Las señales de calcio involucran entonces cambios en la concentración intracelular que deben ser transitorios ya que su elevación prolongada lleva a la muerte celular. ¿Qué es lo que hace entonces que se mantenga un gradiente basal de calcio en las células migrantes?

Los estudios de Tsai et al, 2014 y 2015 muestran que la densidad de bombas que extraen el calcio citosólico para volverlo a su bajo nivel basal y la tasa de remoción de calcio citosólico son mayores en la zona delantera. En base a esto explican la existencia del gradiente. Nuestra hipótesis es que hay otros efectos más rápidamente modificables que a su vez afectan tanto la densidad de bombas como la tasa de remoción del calcio que podrían cumplir también un rol relevante. En particular, en el presente proyecto proponemos usar herramientas de modelado matemático para estudiar el rol que cumple la distinta relación área/volumen en la parte delantera y trasera de las células polarizadas sobre la conformación del gradiente basal de calcio. En caso de contar con disponibilidad suficiente para usar el laboratorio se harán también experimentos para observar y cuantificar el gradiente.

**Modelado matemático**

Plantaremos un modelo para la dinámica del calcio citosólico en términos de ecuaciones en derivadas parciales que tengan en cuenta la difusión del calcio y de las proteínas (buffers) difusibles con las que interactúan los iones (Piegari et al, 2018). El modelo incluirá también las

bombas e intercambiadores que remueven el calcio del citosol (Keener & Sneyd, 1998). Resolveremos las ecuaciones en un sistema de geometría relativamente sencilla, como un “caño” de sección variable. Haremos simulaciones incluyendo o no efectos de “pérdida” de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen del retículo endoplasmático. Con este modelo evaluaremos el rol de los distintos efectos sobre la formación del gradiente cambiando la densidad de bombas, la intensidad de la remoción y la relación área/volumen a lo largo del eje de la simulación. En particular buscaremos cuantificar en qué medida y cuán rápidamente puede variar el gradiente de calcio si alguna de estas propiedades varía en escalas temporales realistas. Compararemos luego esta velocidad de cambio con la velocidad de desplazamiento reportada en la literatura.

### **Trabajo experimental (en caso de ser posible)**

Se buscará expresar un indicador de calcio codificado genéticamente para observar la distribución de los iones en el interior de las células. Una vez que esto se logre se intentará utilizar un constructo combinando este indicador y otro que emita fluorescencia en otro color independientemente de si tiene calcio ligado o no. Miembros del grupo han usado estos constructos, en particular uno que combina GCaMP6f (que emite en el verde al ligar calcio) y un fluoróforo que emite todo el tiempo en rojo, SFmCherry, para observar calcio en levadura (Villarruel et al, 2021). Se evaluará cómo modificarlos para que puedan funcionar en el tipo de células de interés en el proyecto. La observación simultánea de la fluorescencia en ambos colores permitirá estudiar la distribución inhomogénea del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del citosol.

### **Factibilidad del proyecto**

Para las simulaciones numéricas, se habilitará una cuenta para trabajar de forma remota en alguna computadora del grupo o se implementarán las mismas en la nube de Google. En caso de ser posible, el trabajo experimental se haría en el Centro de Microscopías Avanzadas y en el Laboratorio de Microscopía y Microespectroscopía del IFIBA. Entre ambos laboratorios se cuenta con el espacio, los insumos y el equipamiento relevante para la preparación y medición de las muestras. El peso relativo de parte experimental variará dependiendo de la disponibilidad del uso del laboratorio. El plan de tesis se enmarca dentro de un proyecto financiado por UBA (UBACyT 20020170100482BA) recientemente prorrogado para el año 2021 y otro financiado por ANPCyT (PICT-2018- 02026) que se ha comenzado a ejecutar en el 2020.

### **Seguridad e Higiene**

Ambos laboratorios cuentan con planes de seguridad e higiene aprobados por el servicio correspondiente de la FCEN-UBA. La estudiante será entrenada en el uso del equipamiento y la manipulación de muestras y será incorporada al plan una vez que se retorne a la presencialidad. Se adjuntará luego, lo antes posible, la documentación probatoria de todos estos aspectos.

### **Referencias**

- Hahn, K et al (1992) Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature* **359**: 736–738
- Ridley, AJ, et al (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**:1704-9.
- Wei, C, et al (2009) Calcium flickers steer cell migration. *Nature* **457**:901-5.
- Carafoli, E, and Krebs, J (2016) Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator. *J Biol Chem* **291**: 20849 - 20857

- Tsai FC, et al (2014) A polarized Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration, *Nat Cell Biol.* **16**:133-44.
- Tsai FC, et al. (2015) Ca<sup>2+</sup> Signaling in Cytoskeletal Reorganization, Cell Migration, and Cancer Metastasis, *BioMed Research International* 2015, 409245 (2015)
- E Piegari et al (2018) Using two dyes to observe the competition of Ca<sup>2+</sup> trapping mechanisms and their effect on intracellular Ca<sup>2+</sup> signals *Phys. Biol.* **15** 066006
- Keener JP, Sneyd J (1998) *Mathematical physiology*, vol 1. Springer, Berlin
- Villarruel, C, et al (2021) High rates of calcium free diffusion in the cytosol of living cells (envidao)